

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-344415

(P2003-344415A)

(43)公開日 平成15年12月3日(2003.12.3)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/579		G 0 1 N 33/579	2 G 0 4 5
21/78		21/78	Z 2 G 0 5 4
33/483		33/483	C

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願2002-157146(P2002-157146)

(22)出願日 平成14年5月30日(2002.5.30)

(71)出願人 594152620

ダイセン・メンブレン・システムズ株式会
社

大阪府堺市鉄砲町1番地

(71)出願人 595140114

セントラルフィルター工業株式会社

東京都新宿区新宿1丁目34番15号 第二東
興ビル

(72)発明者 石井 清

東京都目黒区大岡山1-19-13

(74)代理人 100106596

弁理士 河備 健二

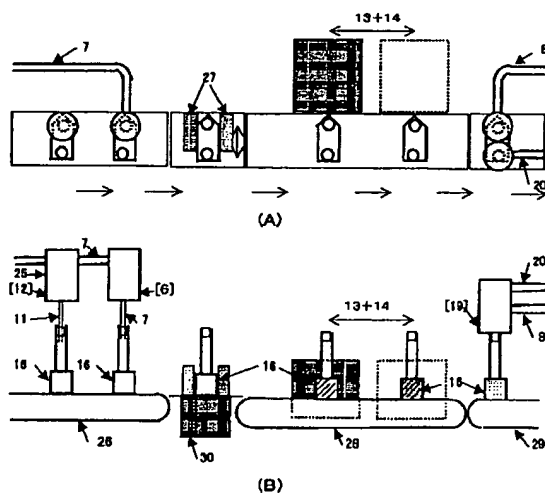
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンドトキシン濃度の測定装置

(57)【要約】

【課題】 注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的にモニターすることができ、かつエンドトキシン濃度が50 EU/L以下の低濃度液、特に10~<1 EU/Lレベルの極低濃度液であってもモニターでき、しかもエンドトキシン濃度を短時間にモニターできるエンドトキシン濃度の測定装置の提供。

【解決手段】 エンドトキシンを含む検体液を、測定回路に順次自動的に取込む手段と、取込まれた検体液に発色合成基質を含むリムルス試薬の所定量を注入して両液を混合させる手段と、検体液中のエンドトキシン濃度を算定する吸光度測定手段と、測定後に混合液を測定セル又は測定セルを含む測定回路から排出する手段と、からなることを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置にて提供。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンドトキシンを含む検体液を、複数の測定セル又は測定セルを含む測定回路に順次自動的に取込む手段と、取込まれた検体液に発色合成基質を含むリムルス試薬の所定量を注入して両液を混合させる手段と、該測定セルに導入された混合液中に遊離する発色基に起因する吸光度の変化量、又はその経時変化率、又は、所定の変化量に到達する時間を測定し、検量線に基づいて検体液中のエンドトキシン濃度を算定する吸光度測定手段と、測定後に混合液を測定セル又は測定セルを含む測定回路から排出する手段と、からなることを特徴とするエンドトキシンの濃度測定装置。

【請求項2】 測定セルの形状を、断面が光源からの光束の断面に等しいか、それ以下の細長い筒形にするか、又は、光束が測定セル内面を複数回反射する多角形の柱体にするにより、光路長を1 cm以上としたことを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項3】 複数の測定セルと、リムルス試薬を注入する手段と、検体液を取込み注入する手段と、測定セルに注入されたリムルス試薬と検体液を混合する手段と、該測定セルに導入された混合液中に遊離する発色基に起因する吸光度の変化量、又はその経時変化率、又は、所定の変化量に到達する時間を測定し、検量線に基づいて検体液中のエンドトキシン濃度を算定する吸光度測定手段と、測定後に混合液を測定セルから排出して洗浄する手段、に順次自動的に接続して、エンドトキシン濃度の測定を連続して行い、更には、1 検体に要する測定時間よりも短い間隔で検体液のエンドトキシン濃度を連続して測定することを特徴とする請求項1～2に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項4】 複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて、吸光度の測定と測定セルの洗浄を並行して行ない、或いは1 検体に要する測定時間よりも短い間隔で連続測定することを特徴とする請求項1～2に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項5】 複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を中心として相対的に回転する複数の測定セルとからなることを特徴とする請求項3～4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項6】 複数の測定系は、複数の測定セルに対して相対的に併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなることを特徴とする請求項3～4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項7】 検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合に、検体量をリムルス試薬量に対して2 倍量～20 倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を測定することを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のエンドトキシンの濃度測定装置。

【請求項8】 光源からの光束を、直径0.4 cm以下に細く絞って、測定セルに入射することを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のエンドトキシンの濃度測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドトキシン濃度の測定装置に関し、更に詳しくは注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、これらの原料の一部となる精製水中に存在すると、多彩な生物活性を示し弊害があるエンドトキシンの濃度を測定し、医療に使用中、或いは医薬品として製造中、または貯蔵中の注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水の品質管理等に役立てるために使用するエンドトキシン濃度の測定装置に関する。

【0002】

【従来の技術】エンドトキシンは、グラム陰性細菌の外膜に存在する耐熱性の毒素であり菌体内毒素と言われ、本体はリボ多糖であるとされている。リボ多糖はリビドAとよばれる脂質と糖鎖からなるが、エンドトキシンとしての活性中心はリビドAにあり、分離したリビドAではほぼすべての活性が再現される。

【0003】エンドトキシンは血液凝固線の反応促進、血小板・白血球の減少、血圧の低下、ショックなど循環系への影響、発熱、サイトカインの誘導、免疫系への影響など多彩な生物活性を示す（竹沢真吾編、透析液エンドトキシンがよくわかる本、15～24頁及び45～51頁（1995）、東京医学社）。エンドトキシンを一構成成分としているグラム陰性細菌は、空気中、水中あるいは食品中に存在し、菌体が機械的損傷を受けたり、死菌が溶解したりあるいは菌体の分裂に際してエンドトキシンが溶液中に放出され、溶液中に存在することとなる。

【0004】したがって、エンドトキシンは、直接的または間接的に、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、これらの原料の一部となる精製水中に混入したり、存在したりすると、上記した多彩な生物活性を示す弊害があるので、エンドトキシンの濃度を測定することは、医療に使用中、或いは医薬品として製造中または貯蔵中の注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水の品質管理に必要である。また、エンドトキシンの濃度をモニターすることは、生菌の増殖を早期に検出する手段としても有効である。しかし、現状ではエンドトキシン濃度をモニターする装置は存在せず、検体液を採取してオフラインでエンドトキシン濃度を測定して、これらの品質管理に役立てている。

【0005】エンドトキシンの濃度を定量測定する方法としては、唯一リムルス試験（Limulus tests

t)がある。この方法は、カプトガニ (*Limulus polyphemus*) の血球中に存在する前凝固性酵素 (Proclotting Enzyme) をエンドトキシンが活性化し、凝固酵素 (Clotting Enzyme) とする反応を利用したものであり、カプトガニ血球抽出成分 (*Limulus amoebocyte lysate*) を試薬として使用する方法であり、ゲル化法と、高感度測定法として比濁法と比色法との三つの方法がある。

【0006】比色法は、発色合成基質法とも呼ばれ、エンドトキシンとリムルス・アメボサイト・ライセート中のC因子系反応によって最終的に活性化された凝固酵素が、コアグロゲンをコアグリンに変換する際のコアグロゲンの水解部位のアミノ酸配列と類似の配列をもつ合成ペプチドに、発色基として例えばパラニトロアニリン (pNA) を結合させた発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNAなど) を用い、活性化された凝固酵素のアミダーゼ活性によって遊離するパラニトロアニリン (pNA) の吸光度を測定してエンドトキシン量を定量する方法である。比色法には、一定時間内に遊離するpNAの量が検体液中のエンドトキシン濃度に比例することに基づき、反応を所定時間で停止してpNAの吸光度を測定するエンドポイント法と、吸光度の経時変化率、又は、所定の吸光度に達する時間を測定するカイネティック法がある。カイネティック法の内、前者は吸光度の経時変化率が検体液中のエンドトキシン濃度に比例することに基づくもので比色反応速度法、後者は、所定の吸光度に達する時間の対数が検体液中のエンドトキシン濃度の対数に逆比例することに基づくもので比色反応時間法と、それぞれ呼ばれている。カイネティック法が感度、精度ともに高く、エンドトキシン濃度の低い検体液に適した方法である。

【0007】しかしながら、既存のエンドトキシン濃度測定機器では、濃度1 EU/Lまで検出するには90～150分の反応時間が必要である (竹沢真吾、石崎允監修、南東北水質検討会編集、透析液エンドトキシン実測集、93頁 (1997)、(株)メディカ出版)。濃度50 EU/L以下の低濃度液、特に10～<1 EU/Lレベルが要求されるHDF透析液のエンドトキシン濃度のモニターとしては時間がかりすぎ不十分であった。また、測定検体量は、リムルス試薬量 (0.1～0.05 ml) と等量が通常であり、この制約から測定セルなどの容積が制限され、光路長を長く取ることも反応液を循環することも困難であった。したがって、エンドトキシン濃度が低濃度の場合に測定が困難であり、また短時間に測定することは困難であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の従来技術の問題点に鑑み、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク

又は供給ラインから、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的にモニターすることができ、かつエンドトキシンの濃度が50 EU/L以下の低濃度液、特に10～<1 EU/Lレベルの極低濃度液であってもモニターでき、しかもエンドトキシンの濃度を短時間にモニターできるエンドトキシン濃度の測定装置の提供を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記の課題に鑑み、注射液、輸液、透析液などの医薬品、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部を取込み、エンドトキシンが低濃度でも短時間に測定できる特定形状の測定セルを有する吸光度測定手段を採用し、各手段を特定に結合すると、良好な結果が得られることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】すなわち、本発明の第1の発明によれば、エンドトキシンを含む検体液を、複数の測定セル又は測定セルを含む測定回路に順次自動的に取込む手段と、取込まれた検体液に発色合成基質を含むリムルス試薬の所定量を注入して両液を混合させる手段と、該測定セルに導入された混合液中に遊離する発色基に起因する吸光度の変化量、又はその経時変化率、又は、所定の変化量に到達する時間を測定し、検量線に基づいて検体液中のエンドトキシン濃度を算定する吸光度測定手段と、測定後に混合液を測定セル又は測定セルを含む測定回路から排出する手段と、からなることを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0011】また、本発明の第2の発明によれば、第1の発明において、測定セルの形状を、断面が光源からの光束の断面に等しいか、それ以下の細長い筒形にするか、又は、多角形の柱体として光束が測定セル内面を複数回反射することにより、光路長を1 cm以上としたことを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0012】また、本発明の第3の発明によれば、第1～2の発明において、複数の測定セルと、リムルス試薬を注入する手段と、検体液を取込み注入する手段と、測定セルに注入されたリムルス試薬と検体液を混合する手段と、該測定セルに導入された混合液中に遊離する発色基に起因する吸光度の変化量、又はその経時変化率、又は、所定の変化量に到達する時間を測定し、検量線に基づいて検体液中のエンドトキシン濃度を算定する吸光度測定手段と、測定後に混合液を測定セルから排出して洗浄する手段、に順次自動的に接続して、エンドトキシン濃度の測定を連続して行い、更には、1検体に要する測定時間よりも短い間隔で検体液のエンドトキシン濃度を連続して測定することを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0013】さらに、本発明の第4の発明によれば、第

1～2の発明において、複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて、吸光度の測定と測定セルの洗浄を並行して行ない、或いは1検体に要する測定時間よりも短い間隔で連続測定することを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0014】さらに、本発明の第5の発明によれば、第3～4の発明において、複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を中心として相対的に回転する複数の測定セルとからなることを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0015】さらに、本発明の第6の発明によれば、第3～4の発明において、複数の測定系は、複数の測定セルに対して相対的に併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなることを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0016】さらに、本発明の第7の発明によれば、第1～6のいずれかの発明において、検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合に、検体液量をリムルス試薬量に対して2倍量～20倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を測定することを特徴とするエンドトキシンの濃度測定装置が提供される。

【0017】さらに、本発明の第8の発明によれば、第1～7のいずれかの発明において、光源からの光束を、直径0.4cm以下に細く絞って、測定セルに入射することを特徴とするエンドトキシンの濃度測定装置が提供される。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明のエンドトキシンの濃度測定装置について、各項目毎に詳細に説明する。

【0019】1. エンドトキシンを含む検体液を測定セル、又は測定回路内に取込む手段

【0020】1. 1 エンドトキシンを含む検体液
本発明においてエンドトキシンを含む検体液とは、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水などであり、検体液は貯槽、タンク、ガラス瓶、プラスチック容器、プラスチックバッグ等の貯蔵手段に貯蔵されており、或は連続的に輸送されており、検体液を本来の目的で使用するときは、貯蔵手段又は輸送手段の一部を出発点とするパイプ、管、ホース等の輸送手段(1)で検体液が使用される使用場所や使用機器に送られる。上記貯留液の一部又は輸送手段(1)中を流れる検体液の一部を、本発明のエンドトキシンの濃度測定装置に導入しエンドトキシンの濃度を測定するが、サンプリングするためには、上記輸送手段(1)の一部に別のパイプ、管、ホース、検定液の取込みポンプ(定量ポンプ)等の輸送手段(2)(図2の7)を設け、支流として検体液の一部を本発明のエンドトキシンの濃度測定装置の測定回路(図3(A)の15)内に取込む。なお、検定液の取込みポン

プ(定量ポンプ)4を省略することもでき、その場合は、減圧弁と定流量弁を設けることが好ましい。

【0021】1. 2 測定セル

本発明において測定セル(図3(A)の16、図3(B)の16、図3(C)の16、図4(A)の16、図(B)の16)とは、検体液中のエンドトキシンの濃度を測定するセル(部屋)であり、本発明で使用する吸光度測定手段の一部を構成し、ここにおいて混合液に光源からの光束を照射しエンドトキシンと発色合成基質を含むリムルス試薬が反応して遊離した発色基パラニトロアニリンによる吸光度を計測する。測定セルの素材としては、光束を透過させる部分は透明性が要求されるので、高純度ガラス、石英ガラスなどが好ましい。測定セルを、測定毎に更新するディスポーザブル部品とする場合は、ポリメチルメタクリレート、ポリ4メチルペンテン1、ポリエチレンテレフタレート等の透明なプラスチックを使用することが好ましい。

【0022】1. 3 測定回路

本発明において測定回路(図3(A)の15、図4(B)の15)とは、検体液とリムルス試薬を反応させる流路であり、検体液の取込み封鎖手段とリムルス試薬注入手段に各々接続し、上記した測定セルを一部に含み、測定後混合液を排出する手段に接続した構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形、楕円形、正方形又は長方形のパイプ(管)で構成されていることが好ましい。パイプ(管)の材質については、上記した測定セル以外の部分では、特に限定されないが、弗素樹脂、ポリ四弗化エチレン、ライニングした金属、SUSのような非ライニング金属、セラミックス等が挙げられ、非汚染性、洗浄性等の観点からポリ四弗化エチレン、弗素樹脂が特に好ましい。なお、本発明においては、測定回路を循環できる構成にして、検体液とリムルス試薬をリサイクル(循環)させ、測定中も両者を均一に混合させ反応させることもできる。

【0023】1. 4 取込み手段

本発明において取込みとは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルに取込むことであり、その手段としては、上記1. 1にて説明したパイプ、管、ホース、検体液の取込みポンプ(定量ポンプ)4等の輸送手段(2)(図2の7)である。輸送手段(2)の構造は、検体液を輸送できる構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形のパイプ(管)で構成されていることが好ましい。パイプ(管)の材質については、特に限定されないが、ガラス、弗素樹脂、ポリ四弗化エチレン、ライニングした金属、SUSのような非ライニング金属、セラミックス等が挙げられ、非汚染性、洗浄性等の観点から弗素樹脂、特にポリ四弗化エチレンが好ましい。なお、検体液の取込みポンプ4は、検体液が圧送されているラインから取り込む場合は省略できる。

【0024】1. 5 封鎖する手段

本発明において封鎖とは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に封鎖することであり、測定回路の入口と出口を封鎖し、測定回路を形成させ、必要に応じてエンドトキシンを含む検体液を測定回路内で循環できるようにするものであり、封鎖手段としては、測定回路の入口と出口を封鎖できれば如何なる構造のものであってもよいが、仕切り（ゲートバルブ）、球形弁（グローブバルブ）、コック（プラグバルブ）、ボールバルブ等が挙げられる。洗浄液を注入する弁9とリムルス試薬を注入する弁12は、チェックバルブまたは注射針などの細管による穿孔を、細管を抜去すれば自己閉鎖する能力を持つ仕切りにすることができる。具体的には、図3において、V1、V3、V4等のバルブ、または、開閉可能な仕切りを閉じた状態にしておけばよい。

【0025】2. 検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させる手段

本発明において、検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合し混合液をつくる手段としては、マイクロポンプ、マイクロシリンジ、パイプレータや揺動器を使用する。

【0026】3. 吸光度測定手段

本発明において、吸光度測定手段とは、測定セルに導入された混合液中に遊離する発色基パラニトロアニリン（pNA）によって混合液に起こる吸光度の経時的変化、又はその経時変化率、又は所定時間に達する時間を連続的に測定して、予め作成した検量線と比較してエンドトキシン濃度を算出して表示、記録、出力する手段であり、光源（図4の13、図5の13）と、光検出器（図4の14、図5の14）と、電子回路（図示せず）と、測定セルから構成される。

【0027】かかる吸光度測定手段の一例としては、下記の手段が挙げられる。すなわち、本発明にて用いる吸光度測定手段は光源13と、この光源からの光を光束とする光学系と、この光学系からの光束が透過する混合液を容れた測定セル16と、測定セル16からの透過光の光路上に配置された光検出器14と、この光検出器14からの電気信号から混合液中の遊離発色基パラニトロアニリン（pNA）に起因する吸光度を連続的に計測して、その変化量、又はその経時変化率、又は所定変化量に達する時間を算定し、予め作成した検量線と比較することによってエンドトキシン濃度を算定する電気回路23とによって構成することができる。

【0028】測定セルはガラス等任意の材料で作ることができるが、光束が通過する部分は透明でなければならない。測定セルの形状としては、円筒状、又は多角柱体が好ましく、光束が直進透過するタイプでは、内径が光束の径に等しく、長さが1cm以上、好ましくは2cm以上の円筒形が好ましく、光束が測定セル内で多重反射するタイプでは高さが光束の径に等しいか、それ以下の多角形柱体が好ましい。測定セルの内面は光が多重に反

射するように鏡面とすることが好ましい。光源としては、ハロゲンランプを用いることができ、光検出器は、高感度の光電子増倍管（フォトマル）が好ましい。

【0029】4. 排出する手段

本発明において排出とは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込み、取込み封鎖された検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させ、混合液の吸光度の経時変化を連続的に測定後に、該混合液を測定回路内から排出することであり、その手段としては、パイプ、管、ホース、検定液の取込みポンプ（定量ポンプ）4等の輸送手段（図3の20）である。なお、排出パイプの開閉バルブは、測定時は閉じた状態になっており、排出させる場合は、開いた状態になっている。

【0030】輸送手段の構造は、検体液を輸送できる構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形のパイプ（管）で構成されていることが好ましい。パイプ（管）の材質については、特に限定されない。軟質チューブ（シリコーンゴム、軟質PVCなど）の使用も可能である。

【0031】5. 複数測定系の自動切換え連続測定手段

本発明において、複数測定系の自動切換え連続測定手段とは、請求項3の「複数の測定セルと、リムルス試薬を注入する手段、検体液を取込み注入する手段、測定セルの混合液を混合する手段、吸光度測定手段に順次自動接続して、エンドトキシン濃度を連続測定する手段」と、請求項4の「複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する手段」であり、それぞれ2つのケースがあ。請求項5のケースは、下記の5. 1に、請求項6のケースは、下記の5. 2に更に詳細に説明する。

【0032】ここにおいて、複数の測定系とは、単数の測定系が2つ以上並列に配置されたものを意味する。単数の測定系とは、図1の（A）に概念図を示すように、検体液を取込み封鎖する手段1、検体液の測定手段2及び検体液を排出し封鎖する手段3からなる1ユニットのエンドトキシンの濃度測定装置における測定手段2であり、2つの測定系とは図1の（B）に示すように、1つ（単数）の測定系が2系列あり、並列になっているものであり、これを更に具体的に構成したものとして、請求項3に対応するものを図4（A）に、請求項4に対応するものを図4（B）に示す。3つの測定系とは図1の（C）に示すように、1つ（単数）の測定系が3系列あり、並列になっているものである。また、請求項3に対応する複数の測定系を具体的に構成したものを図10に示す。

【0033】なお、検体液を取込み封鎖する手段1とは、上記した各手段の結合構造であり、図2（A）に示した結合構造であり、検体液取込みパイプ7と、検体液

の取込みポンプ（定量ポンプ）４、検体液開閉バルブ６と、洗剤液注入パイプ８（オプション）と、洗剤液開閉バルブ９（オプション）から構成される。検体液の測定手段２とは、図３（Ａ）、図３（Ｂ）と、図３（Ｃ）に示した結合構造であり、測定回路１５と、測定セル１６と、光源１３と、光検出器１４と、電子回路（図示せず）と、リムルス試薬注入パイプ１１と、開閉バルブ１２と、から構成される。検体液を排出し封鎖する手段３（オプション）とは、図３（Ａ）に示した、排出パイプ２０と、排出パイプの開閉バルブ１９との結合構造である。

【００３４】なお、複数の測定系の場合、検体液の取込み手段の一部は兼用できるので、図２の（Ｂ）や（Ｃ）のように、検体液開閉バルブより上流は、１つの検体液の取込みパイプ７より構成され、これらより複数の測定系の数が増すほど、図６に示すように複数のエンドトキシンの濃度測定時刻の間隔を短縮することが可能となり、連続的にエンドトキシンの濃度モニターが可能となる効果がある。

【００３５】５．１ 単一の光源とそれに対応する検出器を中心として相対的に回転する関係の複数の測定セル本発明においては、原則として１つの測定系（測定セル）に対して、一組の光源と光検出器を用いるが、光源と光検出器は高価格のものであるから、複数の測定系（測定セル）の場合に各測定系（測定セル）に一組の光源と検出器を付けるとコストアップとなるので、単一の光源とそれに対応する光検出器を特定場所に固定し、その同心円周上に等間隔に配置した複数の測定セルのどちらかを回転・移動し単一の光源とそれに対応する光検出器に順次取りつけ付け、測定セル内の発色基パラニトロアニリンの吸光度を測定してエンドトキシン濃度を算定する。コストダウンと濃度測定装置の容積や重量を省き、小型化し、省スペースと持ち運びを容易にし、メンテナンスの回数も減らせる効果がある。

【００３６】この項における手段の説明は、請求項５に対応するものであり、図７（Ａ）と（Ｂ）に基づき更に詳細に説明する。図７（Ａ）では、１つの測定系（測定セル１６）に対して、一組の光源１３と光検出器１４を用いており、このペアーを１３＋１４を長方形で囲んで表現してある。図７（Ｂ）では、上段に回転移動可能な４つの測定系（測定セル１６が①②③④と４個並べてある。）が示してあり、中段に固定された一組の光源１３と光検出器１４があり、１３＋１４を長方形で囲んで表現してある。上段の左端にある一つの回転移動可能な測定系（測定セル１６①）が、移動し中段に固定された一組の光源１３と光検出器１４に合体し、下段の①の状態になり、微粒子の数が測定される。次いで、上段の左から２番目の一つの回転移動可能な測定系（測定セル１６②）が、移動し中段に固定された一組の光源１３と検出器１４に合体し、下段の②の状態になり、発色基パラニ

トロアニリンの吸光度が測定される。順次、③及び④の発色基パラニトロアニリンの吸光度が測定される。

【００３７】５．２ 複数の測定セルに対して相対的に併進往復する関係の単一の光源とそれに対応する検出器本発明においては、原則として１つの測定系（測定セル）に対して、一組の光源と光検出器を用いるが、光源と光検出器は高価格のものであるから、複数の測定系（測定セル）の場合に各測定系（測定セル）に一組の光源と光検出器を付けるとコストアップとなるので、複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器を付け、コストダウンと濃度測定装置の容積や重量を省き、小型化し、省スペースと持ち運びを容易にし、メンテナンスの回数も減らせる効果がある。

【００３８】この項における手段の説明は、請求項６に対応するものであり、図８（Ａ）と（Ｂ）に基づき更に詳細に説明する。図８（Ａ）では、１つの測定系（測定セル１６）に対して、一組の光源１３と光検出器１４を用いており、このペアーを１３＋１４を長方形で囲んで表現してある。図８（Ｂ）では、上段に移動可能な一組の光源１３と光検出器１４が示してあり、１３＋１４を長方形で囲んで表現してある。矢印で移動を示し、下段にそれぞれ固定されている４個所の測定系（測定セル１６が①②③④と４個並べてある。）に合体する。すなわち、移動可能な一組の光源１３と光検出器１４のペアー（１３＋１４）が、下段の①の状態にある測定系（測定セル１６）に合体し発色基パラニトロアニリンの吸光度が測定される。次いで、移動可能な一組の光源１３と光検出器１４のペアー（１３＋１４）が、下段の②の状態にある測定系（測定セル１６）に合体し発色基パラニトロアニリンの吸光度の経時変化率が測定される。さらに、③および④の状態にある測定系（測定セル１６）に合体し発色基パラニトロアニリンの吸光度が測定される。

【００３９】６． エンドトキシンの濃度測定装置本発明のエンドトキシンの濃度測定装置とは、上記した各手段を有機的に結合した構造体である。上位概念的には、単数の測定系の場合、図１の（Ａ）に概念図を示すように、検体液を取込み封鎖する手段１、検体液の測定手段２及び検体液を排出し封鎖する手段３（オプション）からなる１ユニットのエンドトキシンの濃度測定装置である。２つの測定系の場合は、図１の（Ｂ）に示すように、１つ（単数）の測定系が２系列あり、並列になっている２ユニットのエンドトキシンの濃度測定装置である。これを更に具体的に構成したものを図４に示す。３つの測定系の場合は、図１の（Ｃ）に示すように、１つ（単数）の測定系が３系列あり、並列になっている３ユニットのエンドトキシンの濃度測定装置である。

【００４０】７． エンドトキシンの濃度測定方法本発明において、本発明のエンドトキシンの濃度測定装

置を用いて、下記の方法でエンドトキシンの濃度を測定する。まず、エンドトキシンを含む検体液（注射液、輸液、透析液等の医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水など）が貯蔵されている貯槽、タンク、ガラス瓶、プラスチック容器、プラスチックバッグ等の貯蔵手段から、又は、これらが流れている供給ラインからパイプなどの取込み手段により、検体液を測定セル又は測定回路にポンプで輸送する。なお、流れている供給ラインからの場合は、ポンプを省略できる。次いで、測定セル又は測定回路内に検体液を入れたのち、測定セル又は測定回路の入口と出口のバルブを閉じて測定セル又は測定回路を封鎖する。

【0041】次いで、リムルス試薬注入パイプのバルブ又は仕切りを開き、測定セル又は測定回路内の検体液にリムルス試薬を注入し、振動、又は揺動して、検体液とリムルス試薬の混合液をつくり、遊離した発色基パラニトロアニリンの吸光度を吸光度測定手段の光源と光検出器で測定する。なお、測定セル又は測定回路へのリムルス試薬の導入を検体液導入の前に行ってもよい。測定の終了後、混合液を測定回路内から排出パイプのバルブを開き、排出パイプから廃棄する。この場合、測定回路内及び排出パイプ内を洗浄するために、洗浄液パイプのバルブを開き、洗浄液を測定回路内に導入し、内部を洗浄しながら、測定回路内の混合液を洗浄液と共に流出させ廃棄してもよい。図4（A）の装置では、測定セル、又は測定回路をディスポーザブル部品にでき、混合液の排出と測定セル又は測定回路の洗浄は不要である。

【0042】8. 検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合の測定方法

通常は、検体液量とリムルス試薬量は1：1の比率で両液を混合して得られる混合液を用いてエンドトキシンの濃度測定を行う。測定セルの光路長を1 cm以上、好ましくは2 cm以上にした場合、一過性の測定セルとしては容量／光路長の比が最も小さい細管型よりも更に小さい本発明の多重反射型の特殊な形状の測定セルであっても、断面積を0.1 cm²より小さくしなければ測定セルの内容積が既存のエンドトキシン濃度測定装置で使用する0.1 mlよりも大きくなるため、測定セルを満たすには、混合液量を増量することが必要となる。しかしながら、リムルス試薬は高価なものであるから、検体量の増量に合わせて増量することは経済的な負担が非常に大きくなり、エンドトキシン濃度を連続的にモニターする場合に大きい障害となる。本発明の対象となる検体液は、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水であって、エンドトキシン濃度が低いため、通常の使用条件である検体液と等量のリムルス試薬は、その大部分がエンドトキシンと未反応で残るであろうことに注目して、リムルス試薬量に対して2倍量～20倍量の検体量を混合しても、検体液中のエンドトキシンがリムルス試薬と反応す

る量は、等量混合の場合と殆ど変わらないであろうことに想到して本発明に至った。検体液量をリムルス試薬量に対して2倍量～20倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を使用して遊離した発色基パラニトロアニリンを測定することによって、エンドトキシン濃度が低い検体液のエンドトキシンの濃度を短時間で測定することが、始めて可能となった。この項における方法の説明は、請求項7に対応するものである。

【0043】9. 光源からの光束を細く集光して測定セルに入射する測定方法

光路長を1 cm以上、好ましくは2 cm以上にすると、測定セルの容積を発色合成基質を含む高感度のリムルス試薬であるエンドスペシーを使用する通常の混合液の容積である0.1 mlに収めるためには、本発明の、光路長／容積の比が大きい効率的な測定セルであっても、光束の直径を0.355 cm以下、或は0.25 cm以下に絞ることが必要になり（表1）、光検出器が受ける光量を著しく減少させて感度低下と精度低下の原因となる。光検出器が受ける光量は、光束の面積と強度の積であることに着目すると、一つの方法として光源の出力を高くすることが考えられるが、装置内の限られた空間で発熱を伴う光源の出力を高くすることは、装置内の温度を高くするので好ましくない。そこで、他の方法として光源は変えずにレンズで集光して測定セルに入射すれば、光源の消費電力を増やすことなく、強度を光束径に逆比例して高めることができることに想到した。レンズで集光した光束は並行光線ではなくなるが、測定セルの内面を光線が反射するよう鏡面しておくことによって、入射した全光線が測定セルから入射した時と等しい角度の広がり度で出射される。光検出器を測定セルから離れ過ぎない位置に設定することにより、測定セルから出射される全光線を受取ることができる。従って、混合液量を発色合成基質を含むリムルス試薬を使用する通常の混合溶液から増量することなく、光束径が大きい場合と同様に、高感度、高精度の測定を実施することができる。この項における方法の説明は、請求項8に対応するものである。

【0044】10. 並列の測定セルが3系列の場合の自動切替えダイアグラム

図1（C）に示すように、測定セルが3系列の場合には、第1系列、第2系列、及び第3系列が一定の間隔をおいて、順次、遊離した発色基パラニトロアニリンに起因する吸光度の測定を行い、次いで各系列の洗浄液による洗浄を一定の間隔をおいて、順次行う。洗浄がおわれば、また順次遊離した発色基パラニトロアニリンに起因する吸光度の測定を行う。並列の測定セルが3系列の場合の自動切替えダイアグラムを図9に示した。なお、本発明において、洗浄液は糖脂質と蛋白を溶解するものであって、微量が残留した場合でも、検体液、エンドトキシン、リムルス試薬などに悪影響を及ぼ

さず、エンドトキシンとリムルス試薬との反応を促進したり阻害しないものであれば、いかなるタイプのものであってもよく、塩酸水溶液や界面活性剤から選択することができる。

【0045】11. 特に好ましい実施の形態

現存するリムルス試薬の中で最も感度、精度ともに高いものの一つとして発色合成基質を持つエンドスペース（生化学工業（株）製）があり、検体中のエンドトキシンと反応して、一定時間内に合成基質から遊離する発色基パラニトロアニリンの量がエンドトキシン濃度に比例する（竹沢真吾編、透析液エンドトキシンがよくわかる本、38頁（1995）、東京医学社）ことから、反応液の吸光度係数（遊離した発色基パラニトロアニリン濃度に比例する）がエンドトキシン濃度に比例することになる。

【0046】従って、光検出器が検出する吸光度（＝透過光強度比の対数）が発色基パラニトロアニリンの濃度に比例する吸光度係数 μ と光路長 d の積（ μd ）に比例することに着目して、光路長 d を長くすることによって低い濃度の吸光度係数 μ を測定できることに想到して、その方法を鋭意研究した。測定する反応液の量が、試料と試薬の量が夫々、0.05ml、合計0.1mlと少量で光路長を単純に長くすることはできない。

【0047】そこで測定セルの形状を円筒形にして、その内径を光源からの光束の直径に等しいか、それよりも細くすることによって容積を小さくして光路長を1cm以上、好ましくは2cm以上にすることができ、測定感度を高くすることで、測定可能なエンドトキシン濃度範囲を低い方に拡張し、測定時間を短縮することができる。また、測定セルの断面を多面体にして、1辺から光束を導入して、内面で複数回反射させた後同じまたは他の1辺から導出することによって、等しい内容積の円筒形測定セルよりも50%以上光路長を長くすることができ、測定感度を高くすることで、測定可能なエンドトキシン濃度範囲を低い方に拡張し、測定時間を短縮することができることに想到して本発明の好ましい発明の実施の形態に到った。

【0048】

【発明の実施の形態】【実施態様1】測定セルとして、内径0.5cm、長さ1cm、内容積0.2mlの硬質ガラス管を使用することで、0.25mlの反応液を光路長1cmで測定した。

【0049】【実施態様2】図5及び図6は、複数回反射により光路長を長くする多面体セル（吸光増幅セル）の例である。多面体としては、図5に示すように、長方形の短い方の一辺から2ヶの等しい直角二等辺三角形を切り取ってできた五角形の柱体を選び、光束を該直角二等辺三角形を切り取ってできた一辺（高さと同じ長さ）を光束径に等しいか、その1/2乗に等しい正方形にすることが好ましい）に垂直に入射し、内面で複数回の反射を往

復させた後、もう一つの該直角二等辺三角形を切り取ってできた90°の頂角を介して隣接するもう一つの、入射面と対を成す一面から垂直に導出することによって、光路長を1.5cm以上、好ましくは2cm以上にすることができる。

【0050】図5に示す五角柱で、90°の頂角を介して隣接する2面が辺長0.5cmの正方形、他の3面の辺長が0.71cm、内容積0.31mlの測定セルで3回反射させて光路長を2.5cmにすることができる。また、五角形の寸法はそのまま高さのみ0.39cmにすると、内容積0.25mlで光路長を2.5cmにすることができる。この場合の光束が入り出る面の面積は直径0.5cmの円形の面積に等しい。光束の断面を円形でなく、長方形にできるなら、光路長を等しく維持して、容積を約20%削減することができる。

【0051】なお、多面体は図5に示したような五角柱に限られるものではなく、面数の多い多面体でも複数回の反射が可能であり、その例を図6に示す。円筒型セルと多重反射型直方体の測定セルの光路長とその光束の直径の関係を表1に示す。表1は、光束径を指定すると、多重反射回数が増す程光路長が長くなるが、容積も増すこと、また光路長を指定すると多重反射型の方が容積を小さくできることを示している。

【0052】

【表1】

光束径 D[cm]	円筒型セル (直進、反射なし)				多重反射型五角柱セル			
	L[cm]	V[ml]	L[cm]	V[ml]	(3回反射) L[cm]	V[ml]	(6回反射) L[cm]	V[ml]
0.6	2	0.67	1	0.28	3	0.54	5.4	0.972
0.5	2	0.39	1	0.2	2.5	0.313	4.5	0.563
0.44	2	0.3	1	0.15	2.2	0.213	3.96	0.383
0.43	2	0.29	1	0.15	2.15	0.199	3.87	0.358
0.4	2	0.25	1	0.13	2	0.18	3.6	0.288
0.38	2	0.23	1	0.11	1.9	0.137	3.42	0.247
0.36	2	0.2	1	0.1	1.8	0.117	3.24	0.21
0.355	2	0.2	1	0.1	1.775	0.112	3.195	0.201
0.35	2	0.19	1	0.1	1.75	0.107	3.15	0.193
0.34	2	0.18	1	0.09	1.7	0.098	3.06	0.177
0.32	2	0.16	1	0.08	1.6	0.082	2.88	0.147
0.31	2	0.15	1	0.08	1.55	0.074	2.79	0.134
0.3	2	0.14	1	0.07	1.5	0.068	2.7	0.122
0.28	2	0.12	1	0.06	1.4	0.055	2.52	0.099
0.25	2	0.1	1	0.05	1.25	0.039	2.25	0.07

【0053】筒型セルと多角柱セルの比較を、光路長と容積の比率で表2に示す。等しい光束径で比較すると、多角柱セルの数値が大きく、多角柱セルの方が効率的であることが示されている。

【0054】

【表2】

光束径 D[cm]	円筒型セル		五角柱セル	
	L=2cm	L=1cm	3回反射5回反射	8
0.6	3.54	3.54	5.56	5.558
0.5	5.09	5.09	8	8
0.4	7.96	7.96	12.5	12.5
0.35	10.4	10.4	16.3	16.33
0.3	14.1	14.1	22.2	22.22

【0055】複数の測定セルを、一定の間隔でエンドトキシン濃度の測定装置に順次接続して検体液のエンドトキシン濃度を自動的に連続測定する方式の基本的な例を図4(A)に示す。複数の測定セル(16)を、移動手段(図示せず)によって、所定の間隔で順次リムルス試薬注入口(12)に接続して所定量のリムルス試薬を注入し、次いで検体液取込み口(6)に接続して所定量の検体液を取込み、混合手段(図示せず)によってリムルス試薬と検体液を混合させた後、吸光度測定手段の吸光度測定部(13+14)に接続して吸光度の測定を断続的に繰り返すことによって吸光度の経時変化の連続測定を所定の測定時間実施する。所定の間隔(測定セルが送られてくる間隔、例えば20分)が所定の測定時間(例えば30分)よりも短い場合は、複数の測定セルが順次交代して吸光度測定部(13+14)に接続して交互に断続的な測定を繰り返して、所定の測定時間経過した測定セルから順に洗浄液供給口(9)と混合液排出口(19)に接続して、測定済みの混合液を洗浄液で押出して測定セルを洗浄する。測定セルがディスポーザブルの場合は、排出洗浄手段(9+19)に接続することなく、装置から排出される。なお、検定液取込みバルブは、検体液が滞留することないように、測定セルと接続するとき以外は常時開いて検体液を流出させるよう制御する。また、定量ポンプ4を停止させない場合は、V12の直前にバイパスライン(図示せず)を設けて、V12が開く時のみ同期して閉じるバルブ(図示せず)を設けるか、または、設定圧以上で開放するリリーフ弁(図示せず)を設けるかして検体液の流量と圧力の変動を防ぐように制御する。

【0056】【実施態様3】複数の装置を測定対象液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する方式の基本的な例として、2組の装置(一組の光源と受光器を共用することは可能)を対象液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する装置の例を図4(B)に示す。並列の装置が3系列の場合の自動切換え操作ダイアグラムの例を図9に示す。

【0057】【実施態様4】光束径0.5cmでは、光路長を1cm以上にするには、表1で示すように、円筒型セルで約0.2mlの混合溶液が必要になり、光路長を2cm以上にするためには、円筒型セルで約0.4ml、3回反射型五角柱セルで約0.3mlの混合溶液が必要になる。また、光路長を1cm以上で、且つ、測定セルの内容積をエンドスペースの通常の混合液量である0.1mlに保つには、光束径を円筒型セルで0.355cmに、3回反射型五角柱セルで0.34cm(但し、光路長は1.7cm)に絞ることが必要になる。混合液量を増やすことは、高価なリムルス試薬を標準的な使用量の2~4倍使用することで経済的な負担増が大きく、実施上の障害になる。また、光束を細く絞ること

は、光検出器の出力信号増倍の負担を大きくするだけでなく、精度も低下させるので好ましくない。

【0058】本発明の対象となる検体液のエンドトキシン濃度は低いので、通常検体液量と等量混合したリムルス試薬の大部分は、エンドトキシンと反応しないで残るであろうことに着目して、リムルス試薬量の2~20倍量の検体液を混合しても、検体液中のエンドトキシンがリムルス試薬と反応する量は、標準的な等量混合の場合と殆ど変わらないであろうことに想到した。即ち、本発明では、標準的な等量混合は0.2~2mlになり、光束の直径を太く、測定光道長を著しく長くしても、測定可能なエンドトキシン濃度を従来の一桁低い範囲まで拡張することができ、測定時間も実濃度の一桁高い濃度の検体液に相当する短時間に短縮することができる。

【0059】

【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0060】【実施例1】検体液取込みパイプ7、開閉バルブ6、洗剤液注入パイプ8(図省略)、開閉バルブ9(図省略)、定量ポンプ(図省略)、リムルス試薬注入パイプ11、開閉バルブ付リムルス試薬注入器25、測定回路15、測定セル16、測定セル輸送器26、27、28、29、測定セル振動器30、開閉バルブ19、排出パイプ20、恒温槽21(図省略)、及び移動可能な光源13と光検出器14の結合体からなるエンドトキシン濃度の自動連続測定装置を作成した。これを図10に示す。

【0061】

【発明の効果】本発明の装置によれば、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的にモニターすることができ、かつエンドトキシンの濃度が50EU/L以下の低濃度液、特に10~<1EU/Lレベルの極低濃度液であってもモニターでき、しかもエンドトキシンの濃度を短時間にモニターできる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】装置の構成を示す概念図

図(A)は検体液を取込み封鎖する手段と、検体液の測定手段と、検体液を排出し封鎖する手段が1系列の場合、図(B)は2系列の場合、図(C)は3系列の場合。

【図2】検体液を取込み封鎖する手段の例。図(A)は混合液が測定回路を循環している場合であり、図(B)は測定回路の上部の一部は測定セルとなっていることを示す図。

【図3】検体液の測定手段。図(A)は1系列の場合であり、図(B)は2系列の場合、図(C)は3系列の場合。

【図4】複数の測定セル又は測定系を並列に設置して、自動切換えて順繰りに連続測定する装置の例。図(A)は請求項3に、図(B)は請求項4に対応する図。

【図5】複数回反射により光路長を長くした五角柱セル(吸光増幅セル)の形状を示す図。図(A)は平面図、図(B)は正面図。

【図6】複数回反射により光路長を長くした多面体セル(吸光増幅セル)の例を示す図。

【図7】単一の光源とそれに対応する検出器を中心として回転する複数の測定セルを示す図。

【図8】複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する検出器を示す図。

【図9】並列の測定セルが2系列の場合の自動切換えダイアグラムを示す図。

【図10】請求項3の実施態様の詳細な装置図。図(A)は平面図、図(B)は側面図。

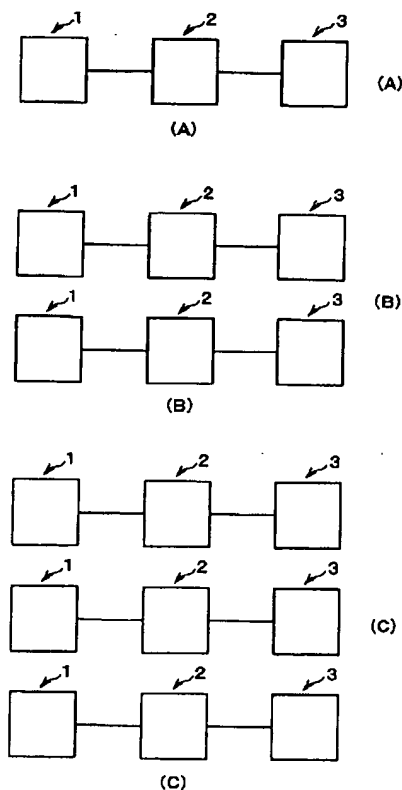
【符号の説明】

- 1 検体液を取込み封鎖する手段
- 2 検体液の測定手段
- 3 検体液を排出し封鎖する手段
- 4 検体液の取込みポンプ(定量ポンプ)
- 6 検体液取込みパイプの開閉バルブ
- 7 検体液取込みパイプ

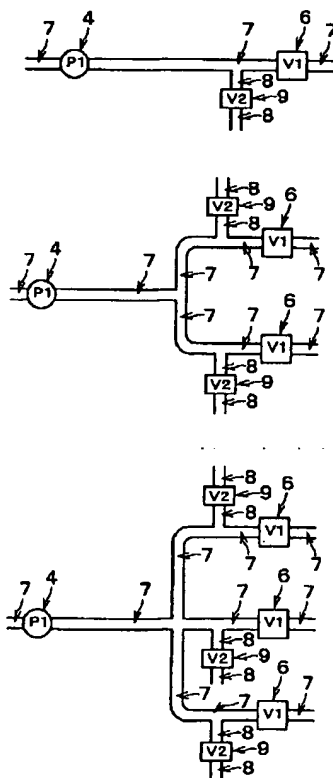
- 8 洗剤液注入パイプ
- 9 洗剤液注入パイプの開閉バルブ
- 11 リムルス試薬注入パイプ
- 12 リムルス試薬注入パイプの開閉バルブ
- 13 光源
- 14 検出器
- 15 測定回路
- 16 測定セル
- 17 循環ポンプ
- 18 ミキサー
- 19 排出パイプの開閉バルブ
- 20 排出パイプ
- 21 恒温槽
- 22 光束
- 23 電気回路(演算部)
- 25 リムルス試薬注入入口
- 26 測定セル輸送器
- 27 測定セル輸送器
- 28 測定セル輸送器
- 29 測定セル輸送器
- 30 測定セル振動器

なお、図4において番号の上付きカンマは、異なる測定系を表わす。

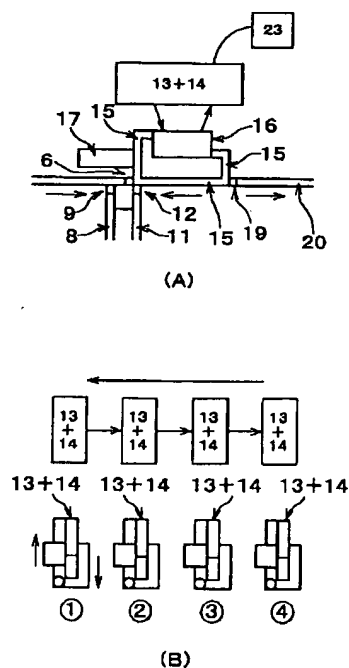
【図1】



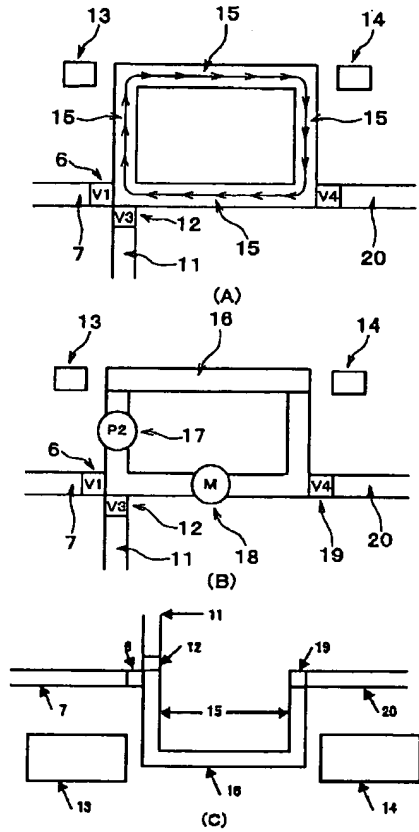
【図2】



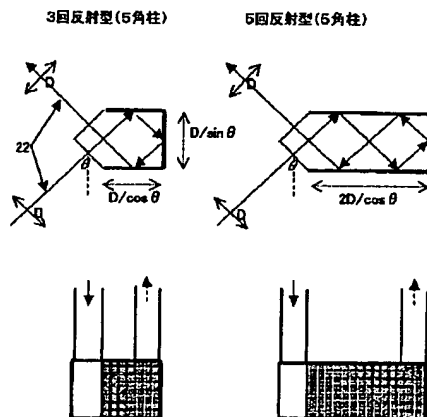
【図8】



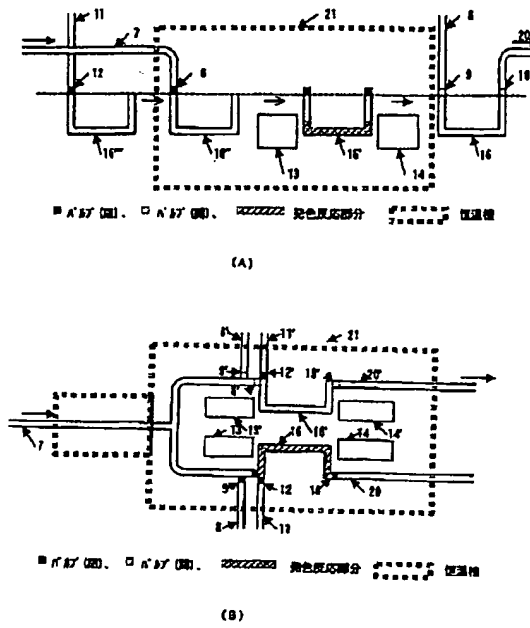
【図3】



【図5】

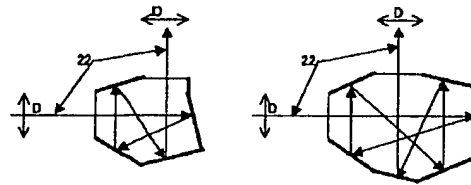


【図4】

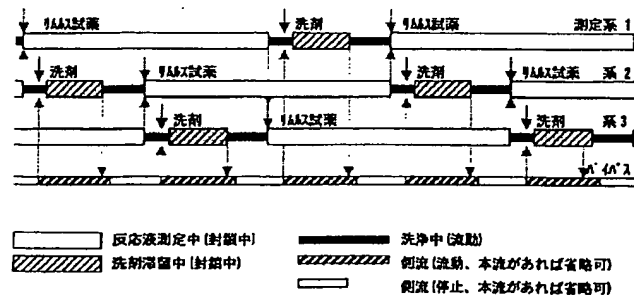


【図6】

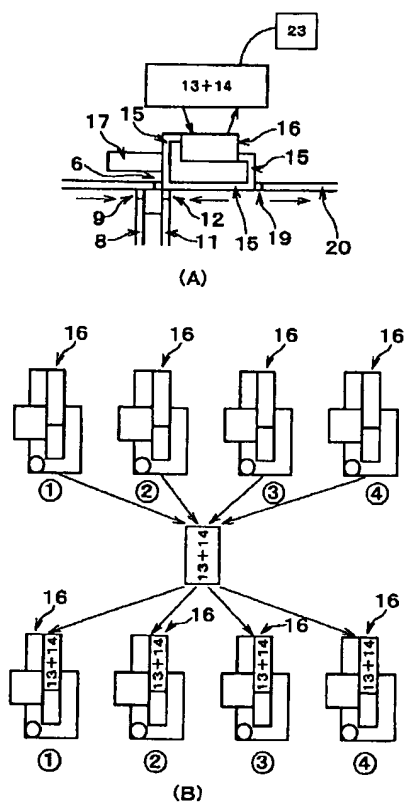
4回反射型測定セル(6角柱) 6回反射型測定セル(8角柱)



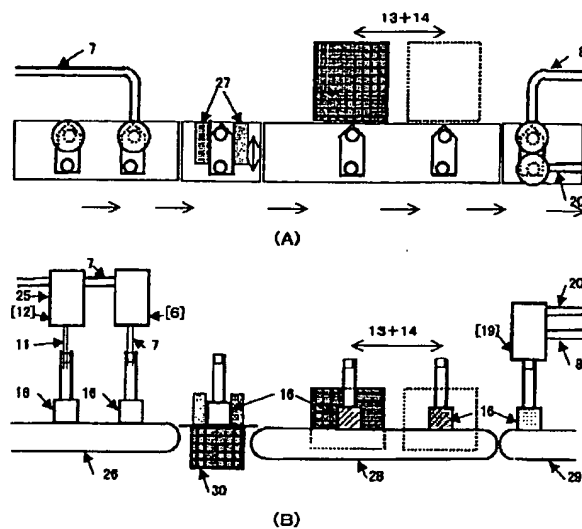
【図9】



【図7】



【図10】



フロントページの続き

(72)発明者 原田 徳三
大阪府大阪市阿倍野区王子町3-13-2
(72)発明者 三浦 薫
千葉県浦安市当代島2-8-1-401

Fターム(参考) 2G045 CB18 DA80 FA11 FB01 GC10
JA07
2G054 AA10 AB03 CA21 CA30 EA04
FA06